

PRODUKSI DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA SENYAWA BIOAKTIF YANG DIEKSTRAK DARI ROTIFER (*Brachionus rotundiformis*) STRAIN LOKAL

Inneke. F. M. Rumengan, N.D. Rumampuk, J. Rimper dan F. Losung

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi

(Email: innekerumengan@unsrat.ac.id)

Abstrak

Rotifer (*Brachionus rotundiformis*), sejenis zooplankton asal Sulawesi Utara telah dikaji sebagai produsen senyawa antibioaktif. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan metode kultur rotifer dengan pemberian mikroalga lokal pada beberapa salinitas sebagai induksi produksi senyawa bioaktif; mendapatkan ekstrak kasar senyawa bioaktif dari rotifer dengan pelarut metanol; dan mengevaluasi aktivitas antimikroba pada beberapa bakteri patogen. Dari rotifer hasil kultur ini telah diekstrak senyawa bioaktif, dan senyawa ini telah diuji aktivitasnya pada 3 jenis bakteri patogen yaitu *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Vibrio cholerae*. Sebagai antibiotik pembanding digunakan tetrasiklin dan amoksisilin. Ada 2 strain yang dicobakan, yaitu strain Manembo-nembo yang pernah dideteksi mengandung senyawa sitotoksik, dan strain Minanga yang belum pernah diuji apakah mengandung senyawa bioaktif atau tidak. Masing-masing strain dikultur pada 3 macam salinitas yaitu 4, 20 dan 40 ppt untuk strain Minanga, dan 40, 50 dan 60 ppt untuk strain Manembo-nembo. Jenis pakan berupa *Nannochloropsis oculata* yang dikultur dalam medium Hirata dalam kondisi kultur baku di laboratorium. Ekstraksi bioaktif dilakukan dengan metoda baku menggunakan pelarut methanol. Ternyata ekstrak kasar senyawa dari rotifer strain Minanga dan strain Manembo-nembo dengan pakan *N. oculata* yang dikultur pada beberapa kadar salinitas, semuanya terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, *B. subtilis*, dan *V. cholerae*. Respons bakteri terhadap senyawa aktif yang dicobakan secara umum terlihat berbeda menurut jenis. Ekstrak dari rotifer yang dikultur pada salinitas tinggi (40 ppt) dengan pakan *N. oculata* menunjukkan aktivitas antimikroba paling tinggi. Bakteri yang paling rentan terhadap ekstrak senyawa dari rotifer yang diberi pakan *N. oculata* adalah *B. subtilis*.

Kata kunci: rotifer, *Nannochloropsis oculata*, bakteri patogen, antimikroba

PENDAHULUAN

Sumberdaya laut yang sangat melimpah dan beragam dapat dimanfaatkan seoptimal mungkin bagi kesejahteraan manusia. Banyak organisme laut berpotensi molekuler yang tinggi, karena dapat menghasilkan berbagai senyawa bioaktif unik dengan nilai farmasetika yang tinggi. Pandangan ini cukup beralasan, karena lingkungan laut dicirikan dengan kisaran kondisi yang sangat luas dan beragam, mulai dari suhu, tekanan, nutrien hingga intensitas cahaya matahari (Jha & Zi-rong, 2004). Keragaman kondisi ini secara langsung mencerminkan tingginya keanekaragaman organisme laut dan senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkannya.

Sejauh ini kurang lebih 10.000 senyawa bioaktif telah diekstraksi dari berbagai organisme laut. Banyak di antaranya menunjukkan aktifitas farmakologi, yang sangat potensial dikembangkan sebagai antimikroba, antikanker dan antiHIV. Namun demikian, senyawa bioaktif dari plankton belum banyak dikembangkan, kecuali yang diekstrak dari fitoplankton seperti dinoflagellata. Akhir-akhir ini, senyawa sitotoksik dan senyawa antimikroba mengundang daya tarik, dikaitkan dengan mewabahnya berbagai penyakit infeksi akibat bakteri dan virus. Senyawa sitotoksik bisa dikembangkan sebagai bahan biopestisida atau anti nyamuk, sedangkan antimikroba bisa dikembangkan sebagai antibiotik.

Rotifer adalah golongan zooplankton yang bersifat holoplankton, sangat populer sebagai pakan alami larva berbagai larva fauna laut, dan juga mempunyai prospek sebagai penghasil senyawa bioaktif (Rumengan, 2007). Salah satu spesies yang dijumpai di perairan Sulawesi Utara adalah *B. rotundiformis*. Spesies ini sudah sejak tahun 1994 didomestikasi di Laboratorium Bioteknologi Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, dan sudah teruji kemampuan reproduksinya yang tinggi, sehingga memungkinkan diproduksi dalam jumlah besar untuk ekstraksi senyawa bioaktif. Penelitian terdahulu terhadap rotifer ini mendapatkan, bahwa pada kondisi ekstrim yakni salinitas rendah (sekitar 4 ppt) dan suhu tinggi (sekitar 35°C) dengan pemberian mikroalga *N. oculata* sebagai pakan, ternyata proporsi miksis yang mengindikasikan adanya senyawa bioaktif tertentu dapat terdeteksi. Namun demikian yang diuji baru aktivitas sitotoksik. Hal ini membuktikan bahwa rotifer dapat dieksploitasi sebagai produsen senyawa potensial untuk dijadikan biomaterial untuk industri farmasi, seperti yang ditemukan baru-baru ini dilaporkan oleh Modaso *dkk.* (2013) dan Rumengan *et al.* (2014). Tujuan khusus yang hendak dicapai adalah (1) Mengembangkan metode kultur rotifer dengan pemberian mikroalga lokal pada beberapa salinitas sebagai induksi produksi senyawa bioaktif; (2) Mendapatkan ekstrak kasar senyawa bioaktif dari rotifer dengan pelarut metanol; dan (3) Mengevaluasi aktivitas antimikroba pada beberapa bakteri pathogen.

METODE PENELITIAN

Kultur Mikroalga

Mikroalga yang dicobakan adalah mikroalga *N.oculata*. Stok mikroalga ini diperoleh dengan melakukan kultur murni di Laboratorium Bioteknologi Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT Manado. Kultur mikroalga dimulai dengan menginokulasi mikroalga ke wadah erlenmeyer berkapasitas 250 ml yang telah diisi dengan medium Hirata yang terdiri dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dan Clewat 32, masing-masing dengan konsentrasi 122,6, 23 dan 15 ppm. Clewat 32 adalah kemasan mengandung berbagai unsur mikro (Fe, Zn, Mn, Co, Cu, N, Bo). Wadah kultur disinari lampu TL 20 watt untuk fotosintesis dan Air Conditioning (AC) untuk menjaga suhu tetap stabil (25°C).

Produksi Rotifer dan Ekstraksi Senyawa Bioaktif

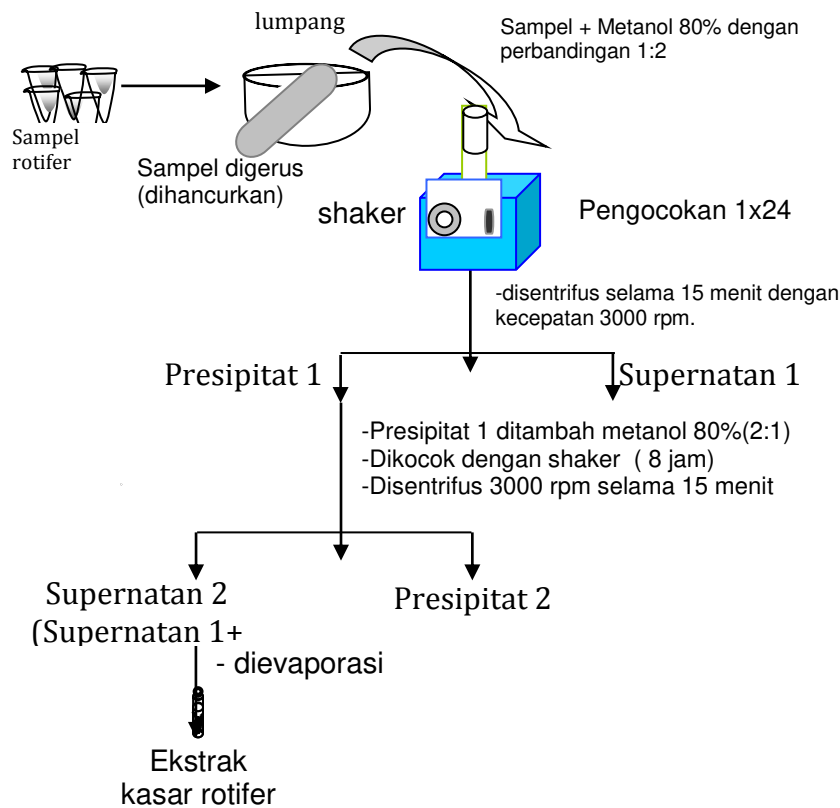
Pada tahap awal rotifer yang digunakan adalah strain Minanga yang sudah dikembangkan di laboratorium. Rotifer ini biasanya dikultur pada suhu dan salinitas optimum yakni suhu 30°C dan salinitas 20 ppt. Kemudian sebagian rotifer diadaptasikan pada salinitas ekstrim 4 ppt dan 40 ppt, dengan menurunkan atau meningkatkan salinitas sedikit demi sedikit setiap dua hari. Selanjutnya rotifer dipindahkan pada wadah gelas berisi 1 liter medium kultur. Untuk keperluan ekstraksi senyawa bioaktif, rotifer dipanen setiap lima hari. Masing-masing diambil dengan menggunakan gelas ukur kemudian disaring. Penyaringannya dikerjakan dalam wadah berisi es. Hasil saringannya disimpan dalam ependorf yang sudah diberi label, setelah itu dibungkus dengan aluminium foil dan diberi label agar mudah diketahui, kemudian disimpan dalam freezer

Selanjutnya, pada tahap kedua karena keterbatasan stok strain Minanga, rotifer yang digunakan adalah strain Manembo-nembo karena berasal dari pertambakan di Sulawesi Utara, yakni di daerah dekat Bitung, Manembo-nembo. Rotifer dicobakan pada salinitas 40, 50 dan 60 ppt sebagai kelanjutan dari salinitas sebelumnya yang pernah dicobakan yang maksimumnya adalah 40 ppt. Rotifer dikultur pada suhu 30°C dalam enam wadah tabung reaksi yang berisi 10 ml air laut steril salinitas 40, 50, 60 ppt dengan pemberian pakan *N. oculata* yang hasil pemanenannya diberi label: 40, 50 dan 60. Untuk keperluan ekstraksi senyawa bioaktif, rotifer dipanen setiap 4 hari sekali, agak lebih cepat sehari dibanding dengan tahap sebelumnya, karena pertumbuhan rotifer ini relatif lebih cepat. Hasil pemanenan dari setiap perlakuan berbeda) disimpan di dalam ependorf yang sudah diberi label, setelah itu dibungkus

dengan aluminium foil dan diberi label agar mudah diketahui, kemudian dimasukkan ke dalam freezer.

Ekstraksi dilakukan mula-mula dengan melakukan *thawing* sampel rotifer. Gambar 1 mengilustrasikan prosedur ekstraksi senyawa bioaktif yang dilakukan. Karena jumlah individu rotifer dalam setiap sampel relatif tidak cukup, maka setiap kali ekstraksi, diambil lima tabung ependorf dari kondisi perlakuan yang sama, hanya waktu panen yang berbeda. Sampel rotifer dimasukkan ke dalam lumpang untuk digerus (dihancurkan), kemudian dihomogenasikan dengan metanol 80% perbandingan 2:1. Homogenat yang ada direndam selama 24 jam sambil dikocok. Selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, supernatan yang ada diambil dengan pipet dan disimpan dalam tabung sedangkan presipitat (endapan) ditambah metanol 80% 2:1 kemudian dikocok lagi shaker selama 8 jam dan disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, supernatan yang diperoleh disatukan, kemudian dievaporasi dengan menggunakan rotary evaporator dan menghasilkan ekstrak kasar.

Ekstrak kasar yang diperoleh selanjutnya disimpan dalam freezer (-20°C), untuk digunakan dalam pengujian selanjutnya. Kandungan bahan aktif dalam setiap ekstrak kasar ini belum diketahui, karena masih memerlukan pemurnian lebih lanjut. Namun sebagai tahap awal pendeteksian daya aktivitas antibakteri sudah dimungkinkan. Penyimpanan bahan ekstrak kasar ini diupayakan tidak mempengaruhi aktivitasnya, dengan menjaga keamanan freezer.



Gambar 1. Prosedur Ekstraksi Bioaktif Rotifer

(3) Inokulasi Bakteri dan Uji Antimikroba

Pada penelitian ini digunakan bakteri uji yang dianggap mewakili golongan maupun bentuk bakteri yakni gram positif, gram negatif, bentuk batang, bulat dan spiral. Bakteri uji tersebut adalah *V. cholerae*, *E. coli*, *S. aureus*, dan *B. subtilis*. Bakteri-bakteri tersebut dikultur pada media agar, kemudian setelah berumur 24 jam masing-masing dimasukkan ke dalam tabung yang berisi larutan saline 0,9 % dan diukur kepadatannya hingga 10^9 sel/ml dengan menggunakan spektrofotometer. Selanjutnya diencerkan sampai kepadatan 10^6 sel/ml. Prosedur standard penyiapan inokulum bakteri ini diupayakan memenuhi kriteria mikrobiologi untuk keamanan laboratorium, termasuk penyimpanan stok yang terkendali.

Antibiotik pembanding yang digunakan adalah amoksilin, ampisilin dan tetrasiklin. Masing-masing dimasukkan sebanyak 250 mg ke dalam erlenmeyer berisi 25 ml aquades. Dari erlenmeyer ini diambil 1 ml dan ditambahkan pada tabung reaksi berisi 9 ml aquades, kemudian diambil 5 ml dan dimasukkan pada tabung reaksi berisi 5 ml aquades (Gambar 1).

Teknik pengujian antibakteri yang digunakan yaitu metode difusi agar dengan cara sumur yang dimodifikasi dari metode sumur Kirby-Baurer. Masing-masing ekstrak kasar rotifer yang diperoleh ditambahkan 1 ml metanol, divortex lalu diambil 50 µl dan dimasukkan dalam sumur yang terbentuk. Media yang digunakan terdiri dari lapisan dasar dan lapisan pembenihan. Lapisan dasar dibuat dengan melarutkan nutrisi agar dalam aquades, kemudian disterilkan dalam autoclave selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Setelah itu nutrisi agar dituang dalam cawan petri steril secara merata masing-masing 15 ml kemudian dibiarkan mengeras. Lapisan Pembenihan dipreparasi dengan melarutkan nutrisi agar dilarutkan dengan aquades dan dipanaskan lalu dimasukkan ke dalam tabung masing-masing sebanyak 8 ml, kemudian disterilkan dalam autoclave selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Selanjutnya ditambahkan 2 ml bakteri uji dengan kepadatan 10^6 sel/ml, lalu divortex dan dituangkan ke atas lapisan dasar dan dibiarkan sampai media tersebut mengeras. Setelah lapisan pembenihan mengeras dibuat beberapa sumur dengan ukuran yang sama, diameternya kira-kira 4 mm dan dimasukkan ekstrak rotifer sebanyak 50 µl. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah diinkubasi 24 jam, diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk yaitu berupa daerah bening sekeliling sumur.

Dalam pengujian ini antibiotik yang dicobakan sebagai pembanding yaitu tetrasiklin untuk bakteri *V. cholerae* dan *E. coli*, ampicilin untuk *S. aureus* dan amoksisilin untuk *B. subtilis*. Sebagai kontrol digunakan metanol. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan cara mengukur zona hambat terbesar dan terkecil, lalu dijumlahkan dan dikurangi dengan diameter sumur sehingga diperoleh diameter zona hambat. Besarnya diameter zona hambat yang terbentuk dari masing-masing ekstrak kasar rotifer dibandingkan dengan yang terbentuk oleh antibiotik dan methanol. Apabila makin besar diameter zona hambat dari ekstrak berarti makin tinggi aktivitas antibakterinya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi rotifer dalam berat basah dengan perlakuan salinitas yang berbeda dan diberi pakan *N. oculata* untuk masing-masing strain lokal disajikan pada Tabel 1 dan 2 berikut ini.

Tabel 1. Berat sampel dan berat ekstrak kasar senyawa dari rotifer strain Minanga yang dikultur pada salinitas 4 ppt, 20 ppt dan 40 ppt dengan pakan *N. oculata*

Perlakuan	Berat sampel rotifer (g)	Ekstrak kasar rotifer (g)
4 ppt	4	0,12
20 ppt	3	0,016
40 ppt	5	0,276

Tabel 2. Berat sampel dan berat ekstrak kasar senyawa dari rotifer strain Manembonembo yang dikultur pada salinitas 40 ppt, 50 ppt dan 60 ppt dengan pakan *N. oculata*

Perlakuan	Berat sampel rotifer (g)	Ekstrak kasar rotifer (g)
40 ppt	3	0.044
50 ppt	3	0.063
60 ppt	2	0.190

Ternyata berat sampel rotifer yang diekstrak senyawa bioaktifnya berbeda-beda menurut perlakuan salinitas, dan hasil ekstraknya juga berbeda namun tidak menunjukkan hubungan yang linier, sebab berat sampel yang sama ternyata berat ekstrak kasarnya berbeda. Hal yang menyebabkan hal ini apakah terkait dengan konsentrasi senyawa dan atau komponen penyusun biomassa rotifer itu sendiri, sebab seperti diketahui rotifer terdiri dari berbagai komponen tubuh termasuk komponen lorikanya. Biomassa yang sama bisa berbeda karena tergantung pada jenis betinanya (betina amiktik dengan atau tanpa telur, betina miktik, tingkat kematangan gonadnya, dan sebagainya. Massa sel dan cara senyawa bioaktif diproduksi juga patut diteliti kemudian.

Berikut ini hasil deteksi aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar senyawa yang diproduksi rotifer, dipaparkan menurut jenis bakteri yang dicobakan (Tabel 4 dan 5), dan sebagai acuan kriteria tingkat aktivitas antibakteri disajikan pada Table 3. Tabel 4 memperlihatkan bahwa ternyata ekstrak kasar dari rotifer strain Minanga yang dikultur pada salinitas 4, 20 dan 40 ppt dengan pakan *N. oculata*, memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis*, terutama ekstrak kasar dari rotifer yang dikultur pada salinitas 20 ppt dengan zona hambat sebesar 2,5 mm. Pada salinitas 40 ppt yang terbentuk zona hambat sebesar 3,75 mm. Sedangkan ekstrak kasar dari

rotifer yang dikultur pada salinitas 4 ppt tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

Tabel 3. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri

Diameter Zona terang	Respon hambatan pertumbuhan
< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
21-30 mm	Sangat kuat

Tabel 4. Diameter zona hambat (mm) ekstrak kasar rotifer strain Minanga yang diberi pakan *N. oculata* terhadap 4 jenis bakteri

Salinitas	Diameter Zona Hambat (mm)			
	<i>B.subtilis</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
4 ppt	0	3 ± 0	0	2.5 ± 0
20 ppt	2.5 ± 0	2.25 ± 0.35	0	2.76 ± 2.19
40 ppt	3.75 ± 0.35	3.5 ± 0.5	0	4.66 ± 0.57
Antibiotik	24.16 ± 0.35	6.83 ± 0.28	0	23.16 ± 3.01
Methanol	0	0	0	0

Keterangan: Nilai rata-rata ± Standar Deviasi (ulangan =3) (0) = Tidak terdeteksi

Tabel 5. Diameter zona hambat (mm) ekstrak kasar rotifer Manembo-nembo yang diberi pakan *N. oculata* terhadap 4 jenis bakteri

Salinitas (ppt)	Diameter zona hambat (mm)			
	<i>B.subtilis</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
40	9.5 ± 2.12	2 ± 0	0	4 ± 0.70
50	4.5 ± 1.41	3.25 ± 1.06	0	2.6 ± 1.04
60	4.25 ± 1.77	3 ± 0	0	1.6 ± 1.15
Antibiotik	24.75 ± 0.35	6.83 ± 0.29	0	23.16 ± 3.01
Methanol	0	0	0	0

Keterangan: Nilai rata-rata ± Standar Deviasi (ulangan = 3) 0= Tidak terdeteksi

Selanjutnya seperti yang dapat dilihat pada Tabel 5, eksperimen lanjut dengan ekstrak kasar rotifer strain Manembo-nembo yang diuji pada bakteri *B. subtilis*, diameter zona hambat lebih besar dari eksperimen sebelumnya. Jelas disini faktor salinitas dan asal rotifer menjadi alasannya. Diameter zona hambat terbesar terbentuk oleh ekstrak kasar dari rotifer pada salinitas 40 ppt yaitu 9.5 mm, sekitar dua kali zona hambat yang terbentuk oleh ekstrak kasar dari rotifer pada salinitas 50 ppt dan 60 ppt, masing-masing hanya 4,5 mm dan 4.25 mm. Daya aktivitas ekstrak kasar dari rotifer, memang belum sebegitu kuat sebagaimana amoksisilin sebagai antibiotik pembanding (24.75 mm), namun sudah terbukti terdeteksi, walaupun masih kurang kuat, karena memang masih perlu dimurnikan.

Terkait dengan respons bakteri *E.coli* terhadap ekstrak kasar dari rotifer strain Minanga dengan pakan *N. oculata* dan dikultur pada salinitas 4, 20 dan 40 ppt. Seperti ditunjukkan pada Tabel 4, ternyata zona hambat terbentuk terhadap semua ekstrak kasar yang diuji. Ekstrak kasar rotifer yang dikultur pada salinitas 4 ppt menunjukkan aktivitas terkecil yakni 2,5 mm, sedangkan ekstrak kasar dari rotifer yang dikultur pada salinitas 20 ppt menunjukkan zona hambat sebesar 2,76 mm. Seperti terhadap bakteri *B. subtilis*, ternyata aktivitas antibakteri terbesar ditemui pada ekstrak kasar dari rotifer yang dikultur pada salinitas 40 ppt dengan zona hambat 4,66 mm. Walaupun daya aktivitasnya belum sekuat antibiotik pembanding, namun pengaruh salinitas terhadap kemampuan rotifer memproduksi senyawa antimikroba sudah terlihat.

Dibandingkan dengan ekstrak kasar rotifer strain Manembo-nembo yang diuji pada bakteri *E. coli*, Tabel 5 menunjukkan bahwa diameter zona hambat terbesar juga terbentuk pada salinitas 40 ppt dengan diameter 4 mm, selanjutnya diikuti 2,6 mm untuk salinitas 50 ppt dan 1,6 mm untuk salinitas 60 ppt. Diameter zona hambat ekstrak untuk tiga salinitas tergolong lemah dan tidak melebihi diameter zona hambat tetrasiklin yaitu 23.16 mm. Kisaran diameter zona hambat yang terbentuk pada *E.coli* ini untuk ke 3 salinitas tinggi kelihatannya tidak sebesar pada *B. subtilis*. Jadi memang respons bakteri terhadap senyawa antibakteri tergantung spesiesnya. Bakteri *E.coli* ini sangat terkenal sebagai bakteri inang dalam pengklonan gen, sering dijadikan tolok ukur terhadap berbagai uji antibakteri. Jika senyawa antibakteri yang diperoleh dalam eksperimen dimurnikan, kemungkinan besar daya

aktivitasnya akan meningkat. Hal ini akan diupayakan pada tahap lanjut penelitian ini.

Aktivitas antibakteri pada semua ekstrak kasar dari rotifer strain Minanga terhadap bakteri *V. cholerae*. Zona hambat yang terbesar terdapat pada salinitas 40 ppt yaitu 3,55 mm, agak lebih besar dari ekstrak kasar dari rotifer yang dikultur pada salinitas 20 dan 4 ppt yang masing-masing 2,25 dan 3 mm. Disini juga jelas bahwa salinitas 40 ppt paling potensial merangsang rotifer memproduksi senyawa antibakteri. Belum diketahui apakah jenis senyawa terkait sama atau berbeda dengan yang diproduksi oleh rotifer yang dikultur pada salinitas lebih rendah atau lebih tinggi dari 40 ppt. Respons bakteri *V. cholerae* terhadap ekstrak senyawa memperlihatkan kemampuan yang cukup resisten, karena zona hambatnya relatif kecil. Banyak faktor yang diduga terlibat disini, sehingga perlu klarifikasi dengan uji coba lanjut dan disinkronkan dengan pemurnian senyawa yang diekstrak.

Respons *V. cholerae* terhadap ekstrak kasar senyawa dari rotifer strain Manembo-nembo yang dikultur pada salinitas 40, 50 dan 60 ppt, menunjukkan bahwa bakteri *V. cholerae* cukup resisten terhadap ekstrak kasar yang dicobakan. Aktivitas antibakteri terbesar terlihat pada salinitas 50 ppt dengan diameter zona hambat yang terbentuk yaitu 3.25 mm diikuti 3 mm untuk salinitas 60 ppt dan 2 mm untuk 40 ppt. Untuk antibiotik pembanding yakni tetrasiklin diameter zona hambatnya 6,83 mm. Pengaruh tetrasiklin disini juga tidak sekuat dibandingkan dengan pada bakteri lain aktivitas antibakteri ini tergolong lemah (< 5mm).

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kasar dari rotifer strain Minanga dengan pakan *N. oculata* baik yang dikultur pada salinitas 4 ppt, 20 ppt maupun 40 ppt tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *S. aureus*. Namun tidak hanya terhadap ekstrak senyawa, juga terhadap antibiotik pembanding terlihat bakteri sangat resisten. Ekstrak kasar senyawa dari rotifer strain Manembo-nembo yang dikultur pada salinitas 40 ppt, 50 ppt dan 60 ppt yang diuji pada bakteri *S. aureus* juga tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri.

Berdasarkan hasil uji ekstrak kasar dari rotifer strain Minanga yang diberi pakan *N. oculata* pada salinitas 4 ppt, 20 ppt, 40 ppt dan strain Manembo-nembo yang dikultur pada salinitas 40 ppt, 50 ppt dan 60 ppt, terlihat bahwa kisaran diameter zona hambat adalah 0 – 9.5 mm, kebanyakan kategori lemah, hanya satu yang kuat yaitu senyawa yang diekstrak dari rotifer yang diberi pakan *N. oculata* pada salinitas 40

ppt terhadap bakteri uji *B. subtilis*. Ini dapat dimaklumi karena yang dicobakan masih sangat kasar masih perlu dimurnikan. Hal yang berikut yang perlu diteliti lagi adalah meningkatkan konsentrasi senyawa dengan memperbanyak stok kultur rotifer, supaya dapat diperoleh biomassa dalam jumlah beberapa gram.

Hal penting berikut yang patut disimak disini adalah adanya perbedaan aktivitas dari masing-masing ekstrak kasar terhadap masing-masing bakteri. Secara umum terlihat bahwa salinitas tinggi lebih besar pengaruhnya terhadap rotifer dalam produksi senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri, terutama salinitas 40 ppt pada rotifer yang diberi pakan *N. oculata* (Tabel 4 dan 5).

Respons bakteri terhadap senyawa aktif yang dicobakan secara umum terlihat berbeda menurut jenis. Namun jika diurutkan menurut besarnya diameter zona hambat pertumbuhan, untuk ekstrak senyawa dari rotifer yang dikultur dengan *N. oculata*, ternyata *B. subtilis* yang paling rentan terhadap ekstrak senyawa dari rotifer yang dikultur pada salinitas 40 ppt (9,5 mm). Tempat kedua adalah bakteri *E. coli* (4,6 mm) dan ketiga *V. cholerae* (3,5 mm) juga terhadap ekstrak senyawa dari rotifer pada 40 ppt. Jelas disini ekstrak senyawa yang paling tinggi aktivitas antibakterinya adalah terhadap *B. subtilis* untuk ekstrak senyawa dari rotifer yang dikultur dengan *N. oculata* pada 40 ppt.

Capaian dalam studi ini menambah informasi ilmiah tentang rotifer strain lokal yang dikultur di Laboratorium Bioteknologi Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT. kajian-kajian terdahulu menemukan bahwa, untuk rotifer strain lokal dari Manem-nembo Bitung, rentang hidupnya 2 – 8 hari dengan pakan *Tetraselmis* sp. dan 2 – 15 hari dengan pakan *Isochrysis* sp. (Palandeng, 1996). Siklus hidup yang unik juga ditemukan pada rotifer strain lokal ini yang juga memproduksi rotifer jantan yang tidak makan seumur hidup, karena tidak mempunyai alat pencernaan, dan tubuhnya lebih kecil dari rotifer betina dan rentang hidupnya singkat (Snell dan Garman, 1986; Rumengan, 1990). Perubahan pola reproduksi tersebut diyakini difasilitasi oleh senyawa-senyawa bioaktif tertentu yang memacu gejala dormansi.

Potensi dormansi rotifer *B. rotundiformis* strain lokal asal Manembo-nembo Sulawesi Utara, telah diteliti oleh Warouw (1997), Rumengan *et al.* (1998) dan Yoshinaga *et al.* (2004). Ketika salinitas turun drastis dan suhu air naik, maka rotifer betina amiktik menghasilkan telur yang akan menetas menjadi betina miktik. Betina

miktik menghasilkan telur yang menetas menjadi jantan dan apabila jantan membuahi betina miktik, maka akan menghasilkan telur dorman (Warouw, 1997). Rumengan *et al.* (1998) kemudian melaporkan pula bahwa jenis alga yang digunakan sebagai pakan dapat mempengaruhi morfometri dan potensi dormansi rotifer ini, dimana jenis alga yang lebih berpeluang meningkatkan proporsi betina miktik adalah *Tetraselmis* sp, walaupun belum dapat dikatakan yang terbaik untuk merangsang pembentukan telur dorman. Bororing (1998) selanjutnya mendapatkan bahwa *Tetraselmis* juga memberi pengaruh terbaik bagi pertumbuhan rotifer secara umum, namun alga *Cyclotella* sp. dan *Dunaliella* sp. lebih nyata pengaruhnya terhadap peningkatan dormansi rotifer. Telur dorman ini sangat tahan terhadap kondisi perairan yang kurang baik dan tahan terhadap kekeringan (Nogrady *et al.*, 1993).

Sebelumnya telah ditemukan oleh Rumengan *dkk.* (2003) bahwa kondisi lingkungan mempengaruhi produksi senyawa antibioaktif ketika rotifer dikultur pada salinitas 20 ppt dengan pemberian *Sticococcus*, *N. oculata*, *Tetraselmis* dan campurannya. Setelah itu sebagian populasi rotifer diadaptasikan pada kondisi ekstrim (suhu 35°C, salinitas 4 ppt). Kemudian rotifer diproduksi massal dengan pemberian *N. oculata* dan *Tetraselmis* pada 4 ppt dan 20 ppt dalam ruangan bersuhu 35°C. Pengamatan terhadap rotifer dilakukan pertama selama 14 hari pada suhu 27°C, dan 70 hari pada suhu 35°C untuk mengetahui pertumbuhan populasi dan prosentase miksisi. Selama periode kultur untuk produksi massal (70 hari), sebagian populasi rotifer dari setiap perlakuan, dipanen secara berkala setiap 5 hari untuk mendapatkan sampel uji untuk ekstraksi senyawa bioaktif. Setelah itu aktivitas ekstrak kasar diuji secara *in vitro* pada sel darah merah manusia. Ternyata ekstrak rotifer yang dikultur dengan *N. oculata* (4 ppt, 20 ppt) dan *Tetraselmis* sp (4 ppt, 20 ppt) tidak memiliki aktivitas sitotoksik pada sel darah merah.

Didorong oleh keinginan untuk mengetahui apakah dalam kultur rotifer ada bakteri yang menginduksi produksi senyawa bioaktif telah dilakukan oleh Rumengan *dkk* (2003), dimana rotifer yang berasal dari tambak Manembo-nembo, dikultur pada salinitas 20 ppt dan suhu 25°C, kemudian dipindahkan ke suhu 35°C dan diberi perlakuan 3 macam salinitas (5, 20 dan 40 ppt). Jenis mikroalga yang digunakan berbeda dengan sebelumnya yaitu mikroalga mirip *Chlorella* strain lokal dengan konsentrasi 3×10^6 sel/ml. Ekstraksi senyawa bioaktif dilakukan dengan metanol 80 %, dimana ekstrak kasar di uji dengan teknik KLT dengan menggunakan bermacam-macam pelarut sesuai polaritasnya. Ekstrak kasar rotifer ternyata

mempunyai efek terhadap pembekuan darah merah dan merubah struktur sel darah merah, walaupun baru teramati pada pengisutan dinding sel beberapa sel darah merah dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan isolasi bakteri dari rotifer *B. rotundiformis*, media kultur rotifer, dan mikroalga mirip *Chlorella*. Hasil isolasi pertama menunjukkan karakteristik bakteri yang tumbuh berbentuk bulat dan berflagella.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Berdasarkan diameter zona hambat yang hanya berkisar 0 – 9,5 mm untuk semua ekstrak kasar senyawa yang diuji, maka ternyata tingkat aktivitas antibakteri tergolong tidak terdeteksi sampai sedang. Jauh di bawah daya aktivitas antibiotik pembanding.
2. Respons bakteri uji terhadap ekstrak kasar berbeda menurut jenis dan asal ekstrak kasar tersebut (salinitas dan jenis pakan). Bakteri yang paling rentan terhadap ekstrak senyawa dari rotifer yang diberi pakan *N. oculata* adalah *B. subtilis*.
3. Secara umum salinitas 40 ppt adalah yang paling potensial merangsang rotifer memproduksi senyawa antibakteri dibandingkan dengan senyawa yang lebih rendah dan lebih tinggi.

Rekomendasi ke depan untuk pengembangan rotifer sebagai produsen antimikroba:

1. Perlu dilakukan produksi massal rotifer pada salinitas 40 ppt untuk memperoleh sampel dalam jumlah yang lebih banyak.
2. Perlu penelitian lanjutan untuk pemurnian dan karakterisasi fisika dan kimia senyawa yang diekstrak dari rotifer.
3. Penggunaan jenis pakan lain akan memberi bukti lebih lanjut akan pengaruh mikroalga terhadap kemampuan rotifer memproduksi bioaktif
4. Senyawa antibakteri dari rotifer berpotensi untuk dikembangkan sebagai antibiotik, namun uji klinis in vivo lebih lanjut jelas perlu dilanjutkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan ke pengelola DP2M DIKTI Kemdikbud yang telah membiayai penelitian ini dengan skim Hibah Bersaing 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Bororing, W.M.R. 1998. Pengaruh Jenis Mikroalga Terhadap Laju Pertumbuhan dan Laju Miksis Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) Asal Tambak Minanga Belang. Skripsi di bawah bimbingan Ir. Suria Darwisito, M.Sc dan Ir.A.J. Lalita, M.Phil. Universitas Sam Ratulangi, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.
- Modaso, R., Suryanto, E., Tallei, T. dan **Rumengan, I.F.M.** 2013. The Yield, Nitrogen Content, and Dye's Binding Capacity of Chitin and Chitosan of

- Rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Aquatic Science & Management*, Edisi KhususI: 99-106. ISSN 2337 - 4403. <http://ejournal.unsrat.ac.id/indewx.php/jasm/index>
- Nogrady, T., Wallace, R.L. dan Sneel, T.W. 1993. Rotifera Vol. 1. *Biology, Ecology and systematic*. SPB. Academic Publishing Netherland. 145p.
- Palandeng, D.L. 1996. Parameter Pertumbuhan Populasi Rotifer *Brachionus plicatilis* yang diberi Pakan *Tetraselmis* sp. dan *Isochrysis* sp. Skripsi. *Fakultas Perikanan. Universitas Sam Ratulangi*. 37 p
- Rumengan, I.F.M. 1990. Studies of Growth Characteristic and Karyotype of S and L type rotifer *Brachionus plicatilis*. Dissertation. Nagasaki University Graduate School of Marine Science and Engineering.
- Rumengan, I.F.M., Warouw, V. and Hagiwara, A. 1998. Morphometry and Resting Egg Production Potential of the Tropical Ultra- Minute Rotifer *Brachionus rotundiformis* (Manado strain) Fed different algae. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.*, Nos 79:31-36.
- Rumengan, I.F.M., Damongilala, L. dan Posangi, J. 2003. Isolasi Bakteri dari Medium kultur dan Ekstraksi Senyawa Bioaktif Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) Strain lokal. Laporan hasil penelitian, Program Penelitian Dasar di Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2002/2003. *Universitas Sam Ratulangi*.
- Rumengan, I.F.M., Posangi, J., Paturusi, A., Rumampuk, N.D. dan Wullur, S. 2003. Manipulasi Lingkungan Hidup Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) Strain lokal untuk produksi Senyawa Bioaktif. Laporan hasil penelitian, Program Riset Pengembangan Kapasitas. *Universitas Sam Ratulangi*.
- Rumengan, I.F.M. 2007. Prospek Bioteknologi Rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Squalen* 2(1):17-21. ISSN 1978-0249
- Rumengan, I.F.M., Suryanto, E., Modaso, R., Wullur, S., Tallei, T.E. and Limbong, D. 2014. Structural Characteristics of Chitin and Chitosan Isolated from the Biomass of Cultivated Rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 3(1):12-18. ISSN:20149-8411;e-ISSN:2049-842X
- Snell, T.W. and Garman, B.L. 1986. Encounter Probabilities Between Male and Female Rotifer. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.: Elsevier*, Vol. 97(221 – 230).
- Warouw, V. 1997. Potensi Dormansi Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) yang Dikultur pada Salinitas dan Suhu Berbeda. Tesis. *Program Pasca Sarjana Universitas Sam Ratulangi*.
- Yoshinaga, T., Minegishi, Y., Rumengan, I.F.M., Kaneko, G., Furukawa, S., Yanagawa, Y., Tsukamoto, K. and Watabe, S. 2004. Molecular Phylogeny of the Rotifers with Two Indonesian *Brachionus* lineages. 2004. *Coastal Marine Science* 29(1):45-56.